



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2010

**Sílvia Maria Cordeiro
Pereira**

**Motilidade celular e produção de
exopolissacarídeos em diatomáceas**



**Sílvia Maria Cordeiro
Pereira**

**Motilidade celular e produção de exopolissacarídeos
em diatomáceas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor João António de Almeida Serôdio, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor associado da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Paulo Jorge Sousa Dias Cartaxana
Professor associado da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Prof. Doutor João António de Almeida Serôdio
Professor associado da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Dedico este trabalho a todas a pessoas que me acompanharam neste longo projecto!

Ao meu orientador, João, porque ao fim destes dois anos ainda acreditou que eu era capaz!

À minha “orientadora de bancada”, Leninha, pela dedicação, pelas horas perdidas, pelos fins de semana passados no Laboratório, mas acima de tudo pela apoio incansável e boa disposição para alegrar os momentos mais difíceis!!

Ao Sílvia, por ter aturado algumas más disposições!!!!

Um grande obrigada aos meus pais e à minha mana por me terem dado o alento e não me deixarem desistir.

À Pat, pelas noites bem passadas e pelos jantares nos fins de semana de trabalho!

A todos os meus amigos e colegas, obrigada!

palavras-chave

Diatomáceas bênticas, EPS, microfitobentos, luz, escuro, motilidade, Latrunculina A.

resumo

As diatomáceas bênticas formam biofilmes à superfície dos sedimentos intertidais estuarinos e constituem um dos grupos de produtores primários mais importantes. Estas microalgas têm a capacidade de se deslocar activamente por entre as partículas do sedimento, processo associado à libertação de substâncias extracelulares poliméricas (EPS). Os EPS são constituídos maioritariamente por hidratos de carbono e a sua produção em ambientes aquáticos é de extrema importância ao nível ecológico, servindo de fonte de carbono para outros organismos (p. ex. bactérias e macrofauna) ou aumentando a resistência à erosão e a estabilidade do sedimento. Este trabalho pretendeu estudar o efeito da iluminação, do estado de fotoaclimação, e da motilidade celular na produção de EPS por diatomáceas bênticas. A produção de EPS foi estudada em suspensões de comunidades naturais bem como em espécies crescidas em cultura. Para a investigação dos efeitos da motilidade celular foi utilizado o inibidor Latrunculina A. Os resultados deste estudo mostraram que em suspensões naturais a produção de EPS leva a uma acumulação durante um período de cerca de 24 h, após o qual os níveis de EPS se mantêm relativamente constantes. Foram igualmente observados efeitos significativos da iluminação na produção de EPS em culturas, dependendo do estado de fotoaclimação das células. A utilização do inibidor Latrunculina A permitiu concluir que, embora as células imobilizadas continuem a libertar EPS, a motilidade celular tem um papel significativo na produção de EPS.

Keywords

Benthic diatoms; EPS, microphytobenthos, light, dark, motility, Latrunculin A.

Abstract

Benthic diatoms form biofilms on the surface of intertidal sediments and have been recognized as one of the most important primary producers in these environments. These photosynthetic microalgae have the ability to move actively through the sediment, a process which is associated with the release of polymeric extracellular substances (EPS).

EPS consist mainly of carbohydrates and its production in aquatic environments have been showed as highly relevant to the ecological function of the ecosystem, as they are used as a carbon source for other organisms (e.g. bacteria and macrofauna) and increase the resistance to erosion and the sediment stability. This work aimed to study the effects of irradiance, photoacclimation state and cell motility in the production of EPS by benthic diatoms. The production of EPS was studied in suspensions of natural assemblages and in the diatoms grown in culture. To investigate the effects of cell motility inhibitor Latrunculin A was used.

The results of the study showed that in natural suspensions, the production of EPS leads to accumulation during a period of 24h, after which the levels of EPS remained relatively constant. There were also significant effects of irradiance on the production of EPS in cultures, this effect being dependent of the photoacclimation state of the cells. The use of inhibitor Latrunculin A allowed to concluded that, although immobilized cell continue to release EPS, cell motility plays an important role in the production of EPS in benthic diatoms.

ÍNDICE

1. Introdução.....	23
1.1. Microfitobentos em ambiente intertidal	25
1.2. Substâncias extracelulares poliméricas (EPS)	27
1.3. Latrunculina A	29
1.4. Objectivos.....	30
2. Material e Métodos	31
2.1. Local de colheita	33
2.2. Colheita e processamento de suspensões naturais	33
2.3. Culturas.....	34
2.3.1. Extracção de EPS: Carbohidratos	34
2.4. Quantificação da concentração de Clorofila <i>a</i>	35
2.5. Latrunculina A	35
2.6. Fluorometria de Pulso Modulado (PAM)	36
2.7. Análise estatística	37
3. Resultados.....	39
3.1. Suspensões naturais	41
3.1.1. Variação ao longo do período de luz	41
3.1.2. Variação ao longo de 24 e 48 horas.....	43
3.2. Suspensões naturais: Luz vs. Escuro	45
3.3. Culturas: Variação ao longo do tempo em resposta a diferentes níveis de luz.....	46
3.4. Efeito da Latrunculina A na produção de EPS	49

4. Discussão	53
4.1. Suspensões naturais: variação horária	55
4.2. Suspensões naturais: Luz vs. Escuro.....	57
4.3. Culturas: Variação ao longo do tempo em resposta a diferentes níveis de luz	58
4.4. Latrunculina A – Inibidor da motilidade celular	59
5. Conclusão.....	63
6. Bibliografia.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) ao longo de um período de baixa-mar diurna. Cada ponto representa o valor médio de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão..... 41
- Figura 2 - Variação dos parâmetros α (Declive inicial da curva de luz), F_v/F_m (Eficiência máxima de luz do PSII) e de ETR_{max} (Taxa de transporte de electrões máxima) ao longo de um período de baixa-mar. Cada barra representa 1 erro-padrão..... 42
- Figura 3 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) ao longo de 24 horas. Cada ponto representa o valor médio de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão..... 43
- Figura 4 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) ao longo de 48 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão..... 44
- Figura 5 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) em amostras exposta à luz e ao escuro, ao longo de 12 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão 45
- Figura 6 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a$) em células fotoaclimatadas a luz alta (LA), posteriormente expostas a 3 níveis de luz de diferentes intensidades ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ao longo de 6 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão 46
- Figura 7 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a$) em células fotoaclimatadas a luz baixa (LB), posteriormente expostas a 3 níveis de luz de diferentes intensidades ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ao longo de 6 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão. 47
- Figura 8 – Análise estatística, com recurso a uma ANCOVA, da existência de diferenças entre o padrão de acumulação de EPS em células fotoaclimatadas a

luz baixa e luz alta, avaliando as diferenças entre os declives das duas rectas e a ordenada na origem.....48

Figura 9 - Monitorização da produção de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ cultura) ao longo do tempo, em amostras controlo e em amostras com adição de Lat A. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.50

Figura 10 - Variação de α (Declive inicial da curva de luz), ao longo de um período de baixa-mar, amostras controlo e em amostras com adição de Lat A. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.51

Figura 11 - Variação do ETR_{max} ao longo de um período de baixa-mar, em amostras controlo e em amostras com adição de Lat A. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados estatísticos do Teste t de "student" aplicado para as diferenças entre o tempo inicial e tempo final dos parâmetros α , ETR_{max} e F_v/F_m	43
Tabela 2 – Resultados estatísticos da ANCOVA para as diferenças entre células fotoaclimatadas a luz alta e células fotoaclimatadas a luz baixa	49
Tabela 3 - Resultados estatísticos do Teste t de "student" aplicado ao tempo final (t=6h) dos parâmetros α , ETR_{max}	52

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Declive inicial da curva de luz
CH	Carbohidratos
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
E	Irradiância ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
EPS	Substâncias Extracelulares Poliméricas
ETR	Taxa de transporte de electrões
ETR_{max}	Taxa de transporte de electrões máxima
F₀	Fluorescência mínima após adaptação ao escuro
F_m	Fluorescência máxima após adaptação ao escuro
F_v	Fluorescência variável
F_v/F_m	Eficiência máxima do fotossistema II (sem unidades)
Lat A	Latrunculina A
LA	Luz alta
LB	Luz baixa
LM	Luz média
MPB	Microfitobentos

1. Introdução

1.1. Microfitobentos em ambiente intertidal

Os sistemas intertidais marinhos são sistemas altamente dinâmicos e produtivos, que se caracterizam por flutuações periódicas dos parâmetros ambientais (Decho 2000, Underwood e Kromkamp 1999). Constituem importantes áreas que separam a terra do mar, actuando como barreira natural e como defesa da costa (Stal 2003). Nos sistemas estuarinos sujeitos à acção das marés, uma fracção substancial da produtividade primária deve-se à actividade fotossintética de comunidades de microalgas bênticas, que ocupam a zona fótica do sedimento formando extensos biofilmes durante a emersão diurna e que são denominadas, genericamente, por microfitobentos (MPB) (MacIntyre et al. 1996).

Os biofilmes microfitobênticos são constituídos por organismos de vários grupos taxonómicos, maioritariamente diatomáceas (Bacillariophyceae), mas também algas verdes (Chlorophyceae), euglenófitas (Euglenophyceae) e cianobactérias (Cyanobacteria) (Pinckney et al. 1994, MacIntyre et al. 1996).

Alguns estudos demonstram que, apesar de limitado aos períodos de exposição à luz (Serôdio e Catarino 1999), os biofilmes fotossintéticos são responsáveis por até 50% da produção primária total dos ecossistemas intertidais estuarinos (Underwood e Kromkamp 1999, Serôdio e Catarino 2000). No entanto, a importância destes microrganismos não se restringe à produtividade primária, sendo que a grande actividade fotossintética do MPB influencia significativamente os fluxos de nutrientes e de oxigénio na interface sedimento-água (Bartoli et al. 2003, Tyler et al. 2003) contribuindo para a grande diversidade destas zonas. Por outro lado, constituem uma importante fonte alimentar para as comunidades pelágicas e de herbívoros nos ecossistemas aquáticos (MacIntyre et al. 1996, Underwood e Kromkamp 1999).

A ocorrência de movimentos verticais rítmicos por parte de diatomáceas é uma característica notável da ecologia do microfitobentos (Round e Palmer 1966, Serôdio et al. 1997, Kingston 1999). Segundo Serôdio et al. (1997) as

microalgas apresentam um ritmo migratório parcialmente endógeno, sincronizado com o ciclo de maré e dia/noite. A motilidade das diatomáceas pode ser afectada por diferentes variáveis ambientais (e.g. luz, temperatura, conteúdo em água do meio envolvente), podendo igualmente variar com a hora do dia (Consalvey et al 2004).

A capacidade do MPB migrar verticalmente no sedimento pode ser considerada uma forma de fotoaclimatação ou fotoprotecção comportamental (Serôdio et al. 2006), permitindo às células evitarem potenciais danos provenientes da exposição a condições extremas de radiação e temperatura (Perkins et al. 2001). O comportamento migratório é também essencial à sobrevivência dos organismos fotossintéticos em ambientes intertidais, permitindo às células migrarem até à estreita e superficial zona fótica do sedimento (Paterson e Hagerthey 2001), após períodos de ressuspensão e de deposição de sedimento; funciona igualmente como mecanismo de protecção contra a herbivoria (Buffan-Dubau e Carman 2000).

As diatomáceas bênticas podem ser classificadas como epipsâmicas, formas aderentes aos grãos de sedimento ou epipélicas, formas com vida livre que exibem capacidade de migração vertical, sendo estas típicas dos sedimentos vasosos (Round 1971, Admiraal 1984, Consalvey et al. 2004).

As diatomáceas epipélicas (encontram-se predominantemente em sedimentos constituídos por partículas de tamanho pequeno) apresentam uma frústula de sílica que contém uma fenda longitudinal chamada rafe. É através desta fenda que ocorre a libertação de substâncias extracelulares poliméricas (EPS, ver secção 1.2.) (Smith e Underwood 1998), que formam uma mucilagem que se liga aos filamentos de actina, gerando a força necessária ao movimento, também designado por "gliding", e a consequente adesão ao substrato. Os EPS são libertados paralelamente ao rafe como resultado das contracções dos microfilamentos do citoesqueleto (Edgar e Pickett-Heaps 1984)(ver secção 1.3 para mais detalhes).

1.2. Substâncias extracelulares poliméricas (EPS)

As zonas estuarinas são reconhecidas pelo seu importante papel, quer ao nível biológico quer ao nível físico, mas são frequentemente sujeitas a estímulos ambientais que afectam o comportamento das espécies aí existentes. A motilidade celular é uma adaptação essencial que permite às diatomáceas bênticas migrarem no sedimento e formarem produtivos biofilmes à superfície destes durante os períodos de baixa-mar, em especial diurna. Associada à motilidade celular e aos biofilmes microfitobênticos surgem os EPS, que têm um papel relevante na estabilização do sedimento e na cadeia trófica estuarina, ao servirem de alimento para organismos de níveis tróficos superiores. Assim, considera-se importante identificar as suas funções e monitorizar a sua produção.

Os EPS são moléculas de cadeia longa produzidas e segregadas pelos organismos que constituem o MPB (Consalvey et al. 2004). São compostos em 95% por polissacarídeos, que podem ser constituídos por açúcares neutros, ácido úrico e/ou açúcares sulfatados (Stal et al. 2003).

Os hidratos de carbono dividem-se normalmente em duas fracções, os hidratos de carbono de baixo peso molecular (solúveis em álcool; "soluble EPS") secretados no meio e que podem ser recolhidos do sobrenadante após centrifugação, e as moléculas poliméricas de elevado peso molecular (não solúveis em álcool; "bound EPS") (Orvain et al. 2003). Segundo Kromkamp et al. (2006) as diatomáceas expelam quantidades substanciais de carbono fixado fotossinteticamente na forma de hidratos de carbono extracelulares, estimando-se para as diatomáceas epipélicas que 30-73% do carbono fixado seja expelido sob a forma de EPS.

As diatomáceas bênticas produzem diferentes tipos de EPS, que variam na estrutura e na composição dos hidratos de carbono, cuja produção varia com as condições ambientais (Staats et al. 2000, Smith e Underwood 2000, de Brouwer e Stal 2002). A quantidade e a composição química dos EPS varia com a radiação, a disponibilidade de nutrientes, a fase de crescimento das células e os ritmos de migração vertical associados à fotossíntese. O resultado

é uma vasta gama de exopolissacarídeos produzidos pelas microalgas presentes nos biofilmes sedimentares, bem como uma contribuição significativa, mas quimicamente não caracterizada, por parte de bactérias (Hofmann et al. 2009). Sabe-se que as diatomáceas bênticas produzem as maiores concentrações de EPS quando em situações de limitação de nutrientes (Underwood et al. 2004).

Existe um interesse considerável no papel dos EPS ao nível celular, por estes evitarem a dessecação, pois na sua forma natural, os EPS são polímeros altamente hidratados e como tal podem servir de depósitos de água, protegendo as células da dessecação. Assim, ao produzirem a matriz de EPS, as células criam um microambiente estável e condições óptimas para o seu crescimento (Decho 2000). São também importantes pela sua acção na adesão das células (Savage e Fletcher 1985; Daniel et al. 1987), na locomoção (Edgar e Pickett-Heaps 1984) e na resistência a toxinas (Decho 1990). Numa escala maior, as secreções orgânicas produzidas pelas células microbianas podem actuar como um importante vector no ciclo do carbono e como fonte de carbono para outros microrganismos e invertebrados (Baird e Thistle 1986, Decho e Moriarty 1990, Decho e Lopes 1993).

A sua função nos ecossistemas intertidais está também relacionada com a estabilização do sedimento, afectando toda a morfodinâmica costeira (Stal e de Brouwer 2003). A bioestabilização pode ser especialmente importante em situações onde o ambiente intertidal é muitas vezes sensível à erosão (Underwood e Paterson 2003). As partículas de menor tamanho do sedimento ficam agarradas na matriz de EPS, provavelmente através das interacções com açúcares substituídos por grupos ácidos (Dade et al. 1990). O nível de estabilidade conferido pelos EPS ao sedimento pode variar com o estado físico (crescimento, divisão celular) e com a composição taxonómica dos produtores, influenciados por diferentes factores abióticos tais como nutrientes e luz (Gerbersdorf et al. 2005).

1.3. Latrunculina A

O movimento das diatomáceas está directamente associado com a produção e secreção de EPS através do rafe. A existência de feixes de actina na região subjacente ao rafe e a observação de uma mucilagem polissacarídea carregada no rafe das células que exibiam motilidade constituem a base da teoria apresentada por Edgar e Pickett-Heaps (1984). Segundo esta teoria, a mucilagem hidratada e intumescida, é excretada através do rafe, e adere ao substrato. O movimento das células é assim gerado à medida que a mucilagem associada aos complexos trans-membranares do plasma se move ao longo do rafe por feixes de microfilamentos intercelulares.

A aplicação de inibidores específicos de actina ou miosina podem afectar, inibindo de modo reversível o movimento das diatomáceas. Este é recuperado 5 minutos após a droga ser removida do meio (Poulsen et al. 1999). Estudos recentes, com o recurso a anticorpos, indicam que os proteoglicanos e as glicoproteínas são componentes funcionais com um papel fundamental na motilidade das diatomáceas. A relevância destes proteoglicanos no deslizamento é demonstrado pela inibição da adesão e motilidade na diatomácea marinha *Stauroneis decipiens* quando adicionados anticorpos monoclonais (Lind et al. 1997).

A Latrunculina A (Lat A) é uma toxina purificada extraída da esponja *Negombata magnifica*, existente no Mar Vermelho (Kashman et al. 1980), que actua na inibição da polimerização da actina *in vivo* (Yarmola et al. 2000) e que mostrou ser uma forte inibidora da motilidade das diatomáceas epipélicas, actuando na dissolução da associação rafe-filamentos de actina (Poulsen et al. 1999). O inibidor Lat A apresenta grande utilidade para estudos sobre o papel da migração vertical na produção de EPS pois permite imobilizar as células sem que a sua actividade fotossintética seja afectada. Cartaxana et al. (2008) mostraram que a Lat A permite parar os movimentos de diatomáceas em cultura sem alterar a sua fisiologia e a sua actividade fotossintética. Um estudo semelhante foi realizado por Cartaxana e Serôdio (2008) que mostrou que a aplicação de Lat A em sedimentos intactos, impede a migração vertical

induzida pela luz sem afectar a actividade fotossintética do biofilme ou perturbar o microambiente da zona fótica.

1.4. Objectivos

O presente trabalho tem como objectivo geral caracterizar a produção de EPS em culturas e em comunidades naturais provenientes do ambiente intertidal da Ria de Aveiro, através da optimização do método de extracção de EPS e do estudo da relação entre a produção de EPS pelo MPB e os factores abióticos aos quais estão sujeitos. Para tal delinearam-se os seguintes objectivos:

- i. Investigar a produção de EPS em suspensões naturais, ao longo de um período diário de luz e durante períodos de 24 e de 48 horas, monitorizando em simultâneo o estado fisiológico das células, para compreender quais os efeitos dos factores abióticos (marés, luz, limitação de alimento, etc.) na produção de carboidratos.
- ii. Estudar a influência da exposição à luz na produção de exopolissacarídeos em comunidades naturais, comparando suspensões expostas à luz com suspensões mantidas no escuro.
- iii. Verificar o efeito que diferentes níveis de luz, aplicados às amostras e que mimetizam as condições a que estas estão sujeitas *in situ*, podem ter na produção de EPS, avaliando-se a resposta de células fotoaclimatadas a luz alta e a luz baixa, a diferentes irradiâncias, ao longo de um período de baixa mar.
- iv. Observar o papel efectivo da motilidade celular na produção de EPS em culturas de *Navicula sp.*, utilizando um reconhecido inibidor, a Latrunculina A.

2. Material e Métodos

2.1. Local de colheita

A Ria de Aveiro é um estuário com morfologia complexa e compreende um ecossistema muito produtivo caracterizado por um elevado número de estreitos canais e de zonas intertidais com elevado valor ecológico e económico (Dias et al. 2000). Tem uma largura de 10 km e comprimento máximo 45 km. Em marés vivas, a área coberta pela preia-mar é de 83 km² sendo reduzida a 66 km² em baixa-mar (Dias et al. 1999, Dias et al. 2000). As marés são propagadas pelo canal da Barra, com cerca de 4000 m² de secção, e são de tipo semi-diurno com uma amplitude média de cerca 2 m (Cunha et al. 2003, Dias et al. 2000).

O estudo foi realizado com recurso a amostras provenientes do banco intertidal localizado no Canal de Ílhavo (40 ° 35 'N, 8° 41' W). O local de amostragem situa-se próximo da Vista Alegre, num pequeno braço da margem esquerda do canal. Este local é caracterizado por um baixo hidrodinamismo e está sujeito a um período de emersão que varia entre 6 a 7 h, ao longo do ciclo semi-lunar de marés. Em termos granulométricos, o sedimento é composto em 90% por partículas de dimensão inferior a 63 µm e representa um habitat característico das zonas intertidais, colonizado por comunidades de MPB dominadas por diatomáceas sobretudo dos géneros *Navicula*, *Nitzschia* e *Gyrosigma* (Serôdio et al. 2005).

2.2. Colheita e processamento de suspensões naturais

No início do período de baixa-mar colheram-se amostras da camada superficial de sedimento para tabuleiros que em seguida foram levados para o laboratório. Foram obtidas suspensões de microalgas bênticas utilizando o método do "*lens tissue*" (Eaton & Moss 1966). Os tabuleiros foram colocados sob irradiância constante de 150 µmol m⁻² s⁻¹ e sob a superfície do sedimento foram colocadas porções de "*lens tissues*" (5x15 cm) durante 30 minutos.

Após esse tempo, os "*lens tissue*" foram recolhidos e ressuspensos em água salgada artificial, obtendo-se deste modo a suspensão de microalgas. As suspensões foram mantidas até ao início da experiência numa câmara de cultura (Growth Cabinet, Sanyo, MA, USA), com um fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro, temperatura constante de 20° C e irradiância de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3. Culturas

Neste trabalho foram utilizadas culturas da diatomácea *Navicula sp.*, isolada a partir do local de colheita. As culturas foram mantidas a temperatura constante 15 ± 1 °C e sujeitas a um ciclo de 12 h luz:12 h escuro. Para avaliar o efeito da intensidade da luz de crescimento na produção de EPS, utilizaram-se culturas que se encontravam fotoaclimatadas a diferentes níveis de luz (LB = 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, LM = 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e LA = 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As células fotoaclimatadas a luz baixa cresceram expostas a uma irradiância de 10-15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ num local independente na câmara de cultura, as células que cresceram fotoaclimatadas a luz alta estiveram expostas a níveis de luz entre os 150 e os 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Para as restantes experiências onde foram usadas culturas fotoaclimatadas a aproximadamente 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foi utilizado meio de cultura f/2 que tem por base água salgada filtrada enriquecida com nutrientes (Guillard 1975).

2.3.1.Extracção de EPS: Carbohidratos

O método comumente utilizado para quantificar EPS ricos em carbohidratos em sedimentos é o método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al.1956). Este método colorimétrico é sensível a uma grande variedade de hidratos de carbono, incluindo açúcares, açúcares metilados e polissacarídeos neutros e ácidos (Decho 1990).

Para a extracção de carboidratos, recolheram-se 2 mL de cada uma das amostras a analisar e procedeu-se à centrifugação durante 5 min a 1500 rpm. Do sobrenadante retiraram-se 200 µL que correspondem à amostra referência. A extracção da fracção coloidal dos EPS baseia-se na proporção 1:1:5 - amostra:fenol:H₂SO₄. Assim a cada 200 µL de amostra foram adicionados 200 µL de fenol 5% (m/v) e 1 mL H₂SO₄. De seguida as amostras foram incubadas a 30°C, durante 35 minutos. Após este tempo efectuaram-se medições de absorvância a 488 nm num espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 6, NY, USA).

2.4. Quantificação da concentração de Clorofila *a*

Dada a importância do MPB nos sistemas estuarinos existe a necessidade de quantificar a biomassa e a sua produtividade. Com o objectivo de normalizar os valores de EPS produzidos utiliza-se a concentração de clorofila *a*, pois esta é um indicador aproximado da biomassa do MPB (Kelly et al., 2001).

Foi quantificada a concentração de Chl *a* pelo método de Lorenzen (1967) em cada uma das experiências efectuadas. A extracção ocorreu em solução aquosa de acetona a 90%, durante 24 horas, no frigorífico e no escuro. Após a extracção procedeu-se à leitura da absorvância a 750 nm (valor de turbidez) e a 665 nm (pico de Chl *a*) (Brotas et al. 1995), utilizando um espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 6, NY, USA).

2.5. Latrunculina A

Foi preparada uma solução stock de Lat A com concentração de 1 µM, a partir da dissolução de Lat A purificado (Sigma Aldrich) em dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução inicial foi armazenada a -20°C até ao início das experiências. A partir desta solução stock foi preparada uma solução com uma concentração de 0.5µM. Esta solução foi adicionada ao meio de cultura no início de cada

tratamento com Lat A. Uma amostra foi observada ao microscópio óptico de forma a verificar a eficácia do inibidor, através da confirmação da imobilidade das células. A célula foi considerada imóvel se não se verificasse movimento durante 10 a 15 segundos (Cartaxana et al. 2008). Este procedimento foi repetido a cada passo da experiência e sempre que havia reforço de meio de cultura com inibidor. Após confirmada a eficácia do inibidor procedeu-se à realização da experiência.

As amostras com Lat A e os respectivos controlos foram expostos a uma irradiância de aproximadamente $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpada de halógeno). Ao fim de cada duas horas as amostras foram centrifugadas e retirados 2 ml do sobrenadante para posterior análise dos EPS e para medições de fluorimetria PAM. Para completar o volume de amostra inicial foi adicionado meio de cultura, com Lat A nas amostras com tratamento e sem Lat A nas amostras do controlo.

2.6. Fluorimetria de Pulso Modulado (PAM)

As medições de fluorescência efectuadas em suspensões foram realizadas usando um fluorómetro PAM, constituído por uma unidade de controlo (PAM – Control Unit, Walz, Effeltrich, Alemanha) e por uma unidade de emissão-deteção WATER-EDFUniversal (Gademann Instruments GmbH, Würzburg, Alemanha). Este aparelho usa uma luz modulada azul (LED com pico de emissão a 450 nm, em que metade da largura da banda é de 20 nm) como fonte de luz de excitação, saturante e actínica (Serôdio 2004). As medições foram realizadas com uma fibra óptica de 6 mm de diâmetro ligada a uma cuvete de fluorescência (KS-101, Walz, Effeltrich, Alemanha). As amostras foram mantidas a uma temperatura constante de 20° C.

A resposta à luz foi caracterizada construindo curvas rápidas de ETR vs. E (curvas de luz em estado estacionário). Cerca de 1 ml de suspensão/cultura foi colocado na cuvete do PAM e submetido a 5 minutos de adaptação ao nível de luz corresponde ao mesmo a que as amostras se encontravam expostas.

Seguidamente a amostra foi submetida a níveis crescentes de luz actínica, desde 0 a $920 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Foram construídas curvas ETR vs E (PAR) (ver lista de abreviaturas para referência detalhada) e ajustadas ao modelo de Platt et al. (1980). Os parâmetros, α e ETR_{max} foram determinados para cada curva. O modelo foi ajustado por minimização da função dos quadrados mínimos, utilizando o MS Excel Solver. Para a maioria das situações o ajuste da curva foi muito bom ($R^2 > 0.975$).

2.7. Análise estatística

Foi utilizado o software STATISTICA 8.0. para aplicação da análise de co-variância (ANCOVA) à relação entre a concentração de EPS e o tempo para os diferentes níveis de irradiância. Para assegurar os pressupostos da homogeneidade dos declives foi previamente realizado um teste-F que permitiu comparar os declives das regressões lineares, posteriormente foi testada a hipótese de existirem diferenças significativas na origem (Zar 1996). Testes t de "student" foram realizados para verificar diferenças entre a produção de EPS na luz e no escuro, entre o tempo inicial e o tempo final das várias experiências de monitorização ao longo de períodos de baixa-mar, 24 e 48h, bem como as diferenças entre a concentração de EPS na presença e ausência de inibidor de motilidade (Lat A).

Realizou-se uma Anova 1-via para testar diferenças ao longo do tempo, na produção de EPS.

Foram ainda realizados teste t de "student" para verificar a existência de diferenças significativas entre os parâmetros obtidos nas curvas ETR vs. E das experiências de monitorização da produção ao longo do tempo e da aplicação do inibidor. Todo o procedimento estatístico foi realizado com base em Zar (1996).

3. Resultados

3.1. Suspensões naturais

3.1.1. Variação ao longo do período de luz

A variação da concentração da fracção solúvel de carboidratos em comunidades naturais foi monitorizada ao longo de um período de 11h. A concentração de EPS produzidos variou entre os 0.303 e os 0.329 $\mu\text{g CH ml}^{-1}$ de suspensão (Figura 1). A análise estatística mostrou que não existem diferenças significativas ao longo do período de iluminação, verificando-se do mesmo modo ausência de diferenças significativas entre a concentração de EPS no tempo inicial e no tempo final da experiência (valores do teste Anova 1-via : $F = 1.970$, $p = 0.156$ - não há diferenças significativas ao longo do período de iluminação).

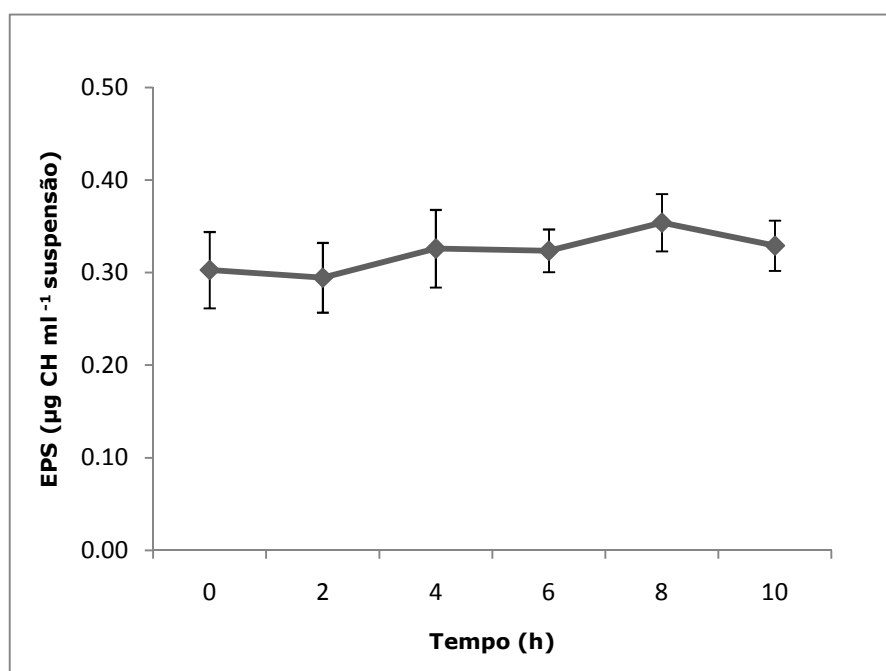


Figura 1 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) ao longo de um período de baixa-mar diurna. Cada ponto representa o valor médio de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

A Figura 2 mostra a variação dos parâmetros α , ETR_{max} e F_v/F_m estimados para as amostras a partir das quais foram extraídos os EPS ao longo do mesmo período de tempo. Não se observaram variações significativas nos parâmetros α (com valor inicial de 0.597 e final de 0.563) e ETR_{max} (valor inicial de 140 e valor final de 137) entre o tempo inicial e o tempo final do tratamento experimental.

A eficiência fotossintética máxima das suspensões naturais analisadas (F_v/F_m) apresentou valores médios de 0.6, oscilando entre 0.65 no início da experiência e 0.63 no final, não se tendo verificado alteração significativa ao longo do tempo (Tabela 1) indicando uma boa condição fisiológica das células.

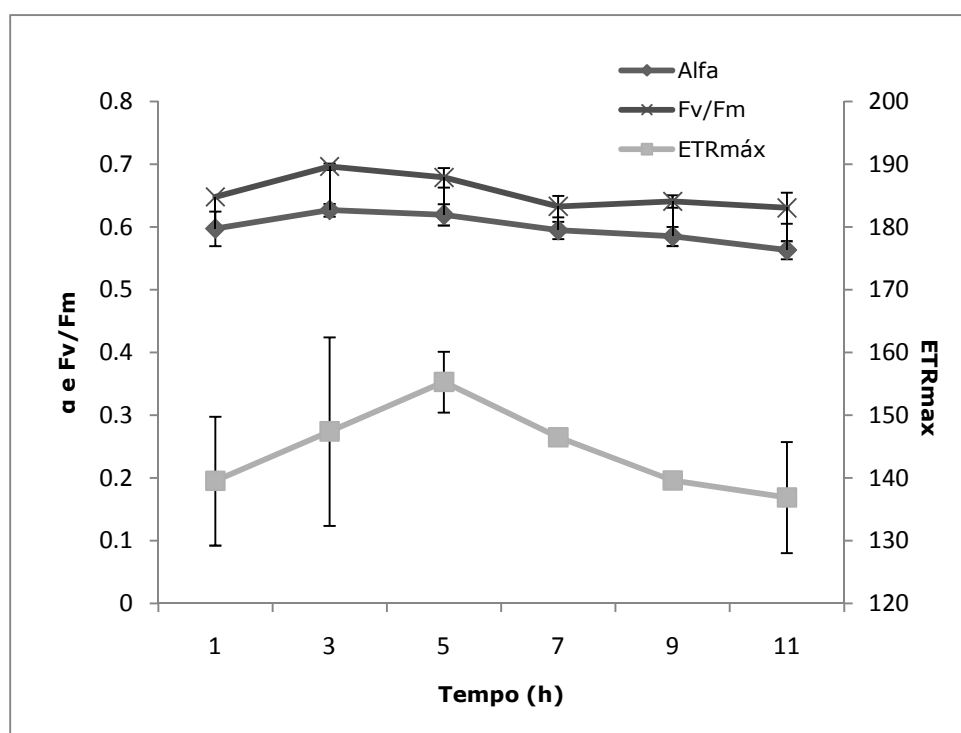


Figura 2 - Variação dos parâmetros α (Declive inicial da curva de luz), F_v/F_m (Eficiência máxima de luz do PSII) e de ETR_{max} (Taxa de transporte de electrões máxima) ao longo de um período de baixa-mar diurna. Cada barra representa 1 erro-padrão.

Tabela 1 - Resultados estatísticos do Teste t de "student" aplicado para as diferenças entre o tempo inicial e tempo final dos parâmetros α , ETR_{max} e F_v/F_m

	Grau de Liberdade	T	P	
α	2	1.539	0.265	$P > 0.05$
ETR_{max}	2	0.273	0.810	$P > 0.05$
F_v/F_m	2	1.000	0.423	$P > 0.05$

3.1.2. Variação ao longo de 24 e 48 horas

Suspensões monitorizadas ao longo de um período de 24 horas mostraram um aumento significativo da concentração de EPS, variando entre 0.309 ± 0.009 e $0.505 \pm 0.126 \mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão, (Teste t "student", $T = -2.69$, $P = 0.05$).

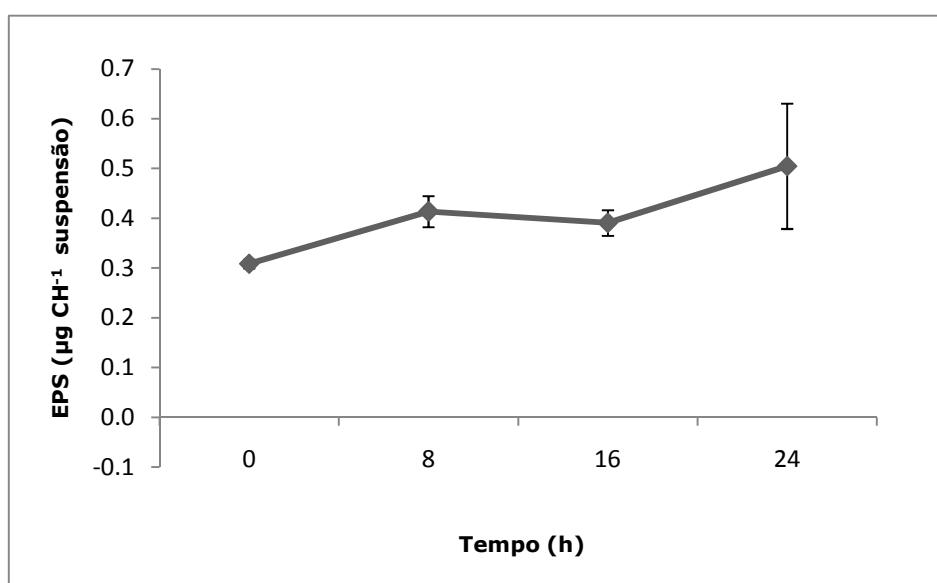


Figura 3 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) ao longo de 24 horas. Cada ponto representa o valor médio de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

Observou-se o mesmo padrão de aumento ao longo das 48 horas (Figura 4) com a concentração de hidratos de carbono produzidos a aumentar ao longo do tempo, entre 0.112 ± 0.005 e $0.245 \pm 0.033 \mu\text{g CH ml}^{-1}$ de suspensão. Verificou-se existirem diferenças significativas entre a concentração de EPS entre as 0 e as 48 horas (Teste t "student", $T = -6.824$, $P < 0.05$).

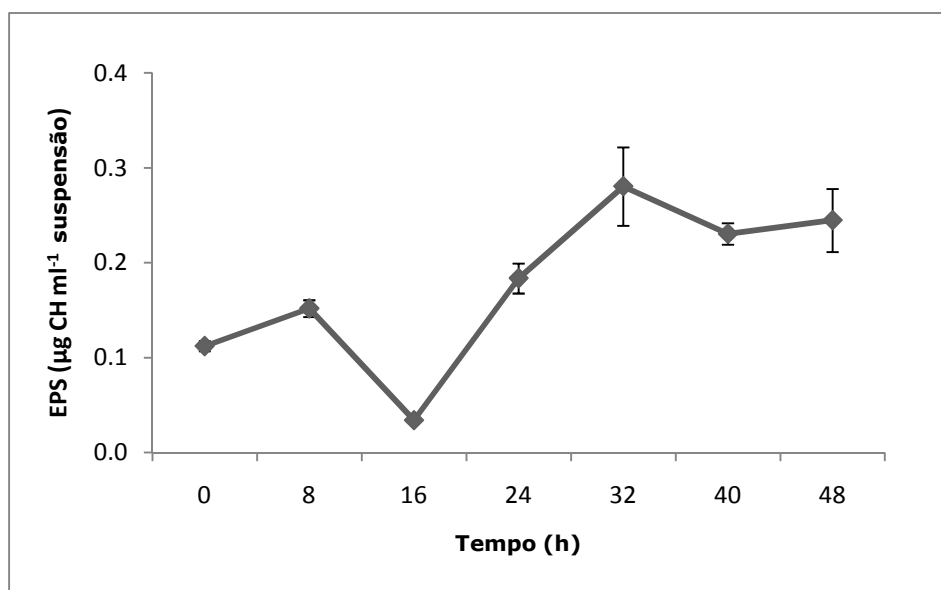


Figura 4 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) ao longo de 48 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão

Quando comparados os valores da concentração de EPS às 24 h e 48 h verificou-se não existirem diferenças significativas (Teste t de "student", $T = -2.341$, $P = 0.101$), pelo que a quantidade de EPS produzida estabilizou a partir das 24h, mesmo que as diferenças em relação ao tempo inicial tenham persistido. Verificou-se uma quebra pontual no valor da concentração de EPS no final de 16 horas e no final de 40 horas.

3.2. Suspensões naturais: Luz vs. Escuro

Verificaram-se diferentes respostas na produção de EPS ao longo do tempo, em amostras expostas à luz e em amostras colocadas sob condições de escuro constantes.

Nas amostras expostas à luz, a concentração de carboidratos solúveis aumentou significativamente com o tempo, variando entre 0.895 e 1.667 $\mu\text{g CH ml}^{-1}$ de suspensão (ANOVA 1-via: $F = 9.30$, $P < 0.01$) (Figura 5).

Nas amostras sujeitas a um período contínuo de escuro verificou-se uma taxa de produção de EPS inferior (com valor inicial de 0.435 $\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão e valor final de 0.335 $\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão), sem ocorrerem variações significativas na produção de CH em função do tempo (ANOVA 1-via: $F = 0.453$, $P > 0.05$).

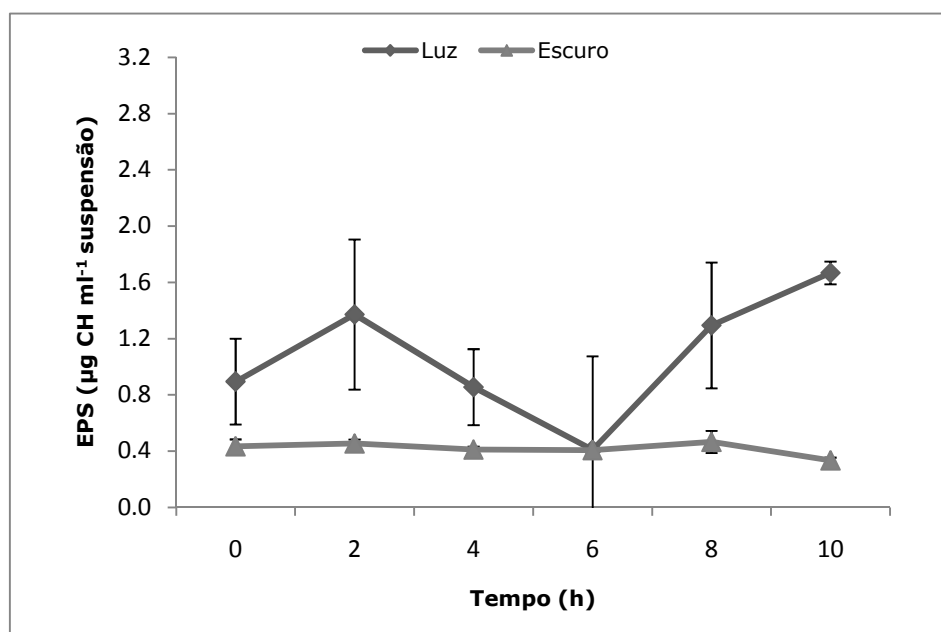


Figura 5 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ suspensão) em amostras exposta à luz e ao escuro, ao longo de 12 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

Quando se compararam os valores de EPS em amostras no escuro com amostras expostas à luz não se encontraram diferenças significativas no

período inicial da experiência (Teste t "student", $T = 1.264$; $P = 0.262$). Contudo, no final do tratamento (12 horas) as amostras inicialmente iguais no que respeita à concentração de EPS, apresentam diferenças muito significativas (Teste t "student", $T = 13.779$; $P < 0.001$).

3.3. Culturas: Variação ao longo do tempo em resposta a diferentes níveis de luz

Células fotoaclimatadas a luz alta apresentam semelhantes taxas de acumulação de EPS quando expostas a diferentes intensidades (Figura 6). Observou-se um aumento contínuo no valor de EPS acumulado em função do tempo. No entanto, as células expostas a um nível de luz intermédio atingiram um valor de concentração final de CH superior às restantes amostras (valor médio máximo de $3.52 \mu\text{g CH } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a$)

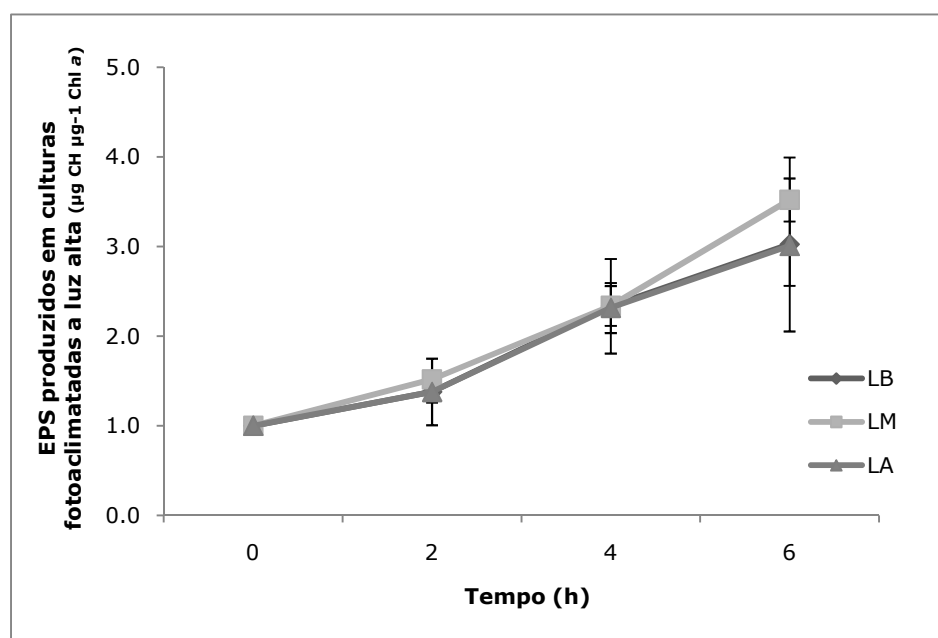


Figura 6 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a$) em células fotoaclimatadas a luz alta (LA), posteriormente expostas a 3 níveis de luz de diferentes intensidades ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ao longo de 6 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

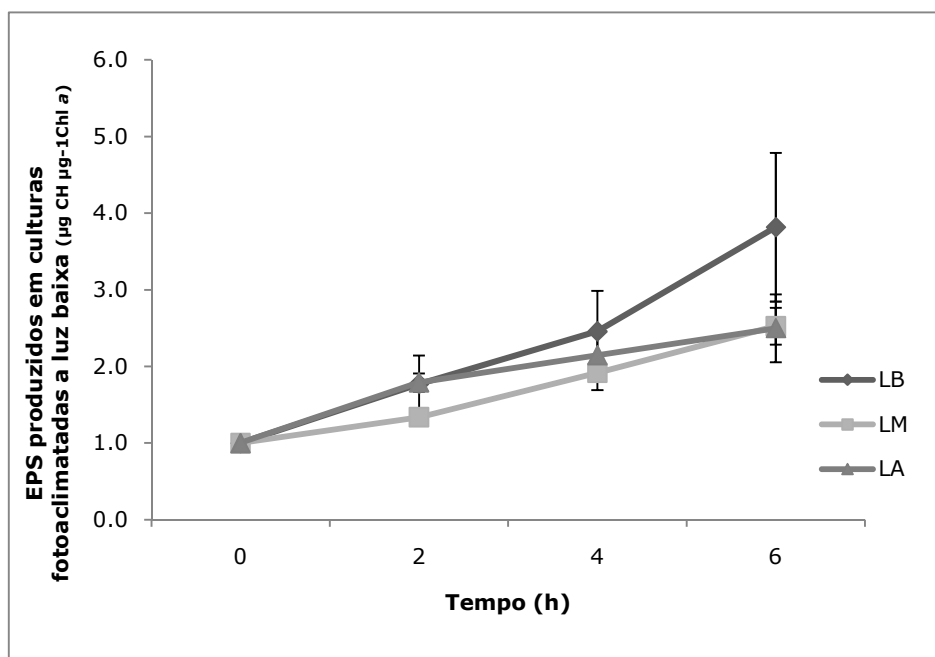


Figura 7 - Variação da concentração de EPS ($\mu\text{g CH } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a$) em células fotoaclimatadas a luz baixa (LB), posteriormente expostas a 3 níveis de luz de diferentes intensidades ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ao longo de 6 horas. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

Culturas fotoaclimatadas a luz baixa apresentam taxas de acumulação de EPS com o mesmo padrão de aumento em função do tempo (Figura 7), verificando-se todavia uma taxa superior para células expostas a luz baixa ($3.82 \mu\text{g CH } \mu\text{g}^{-1} \text{ Chl } a$.)

A existência de diferenças entre o padrão de acumulação de EPS em células fotoaclimatadas a luz baixa e luz alta foi analisado através de uma ANCOVA, que permitiu testar as diferenças entre os declives das duas rectas e a ordenada na origem.

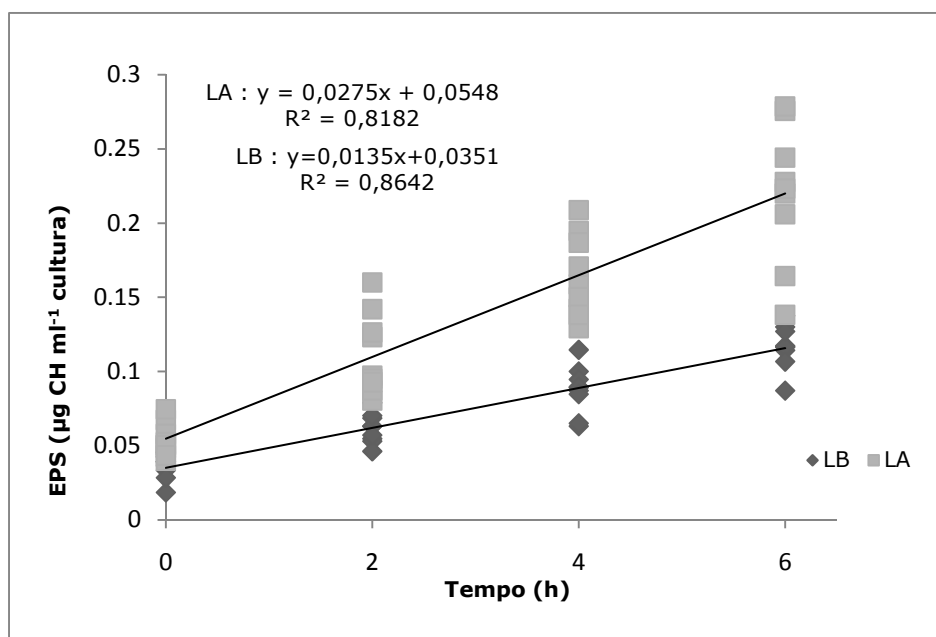


Figura 8 – Análise estatística, com recurso a uma ANCOVA, para verificar a existência de diferenças entre o padrão de acumulação de EPS em células fotoaclimatadas a luz baixa e luz alta, avaliando as diferenças entre os declives das duas rectas e a ordenada na origem.

Numa abordagem inicial foram analisadas possíveis diferenças entre os declives e as ordenadas na origem das rectas que representam o padrão de acumulação de EPS de cada amostra (Figura 6) e (Figura 7). Posteriormente, não se tendo observado diferenças entre os declives e as ordenadas na origem (Tabela 2) foi usada uma recta única para descrever a acumulação de EPS em culturas fotoaclimatadas a luz baixa e outra para culturas fotoaclimatadas a luz alta (Figura 8). Foi novamente efectuada uma ANCOVA, tendo desta vez demonstrado a existência de diferenças significativas entre o declive e ordenada na origem das rectas de acumulação de EPS para os dois níveis de fotoaclimação (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados estatísticos da ANCOVA para as diferenças entre células fotoaclimatadas a luz alta e células fotoaclimatadas a luz baixa

		Grau de Liberdade	F	P
LA	Declive	2	0.314	0.733
	Ordenada na origem	2	0.772	0.470
LB	Declive	2	1.156	0.328
	Ordenada na origem	2	1.021	0.371
LA vs LB	Declive	1	34.15	0.000
	Ordenada na origem	1	89.39	0.000

3.4. Efeito da Latrunculina A na produção de EPS

A aplicação de Lat A permitiu verificar os efeitos da motilidade na produção de EPS ao longo do tempo. A comparação entre amostras inibidas e com motilidade activa mostrou que ambas apresentam acumulação de EPS em função do tempo. No entanto, em culturas inibidas pela presença de Lat A no meio de cultura, ao fim de 6 h de tratamento verificou-se que a taxa de acumulação é inferior à verificada nas amostras controlo.

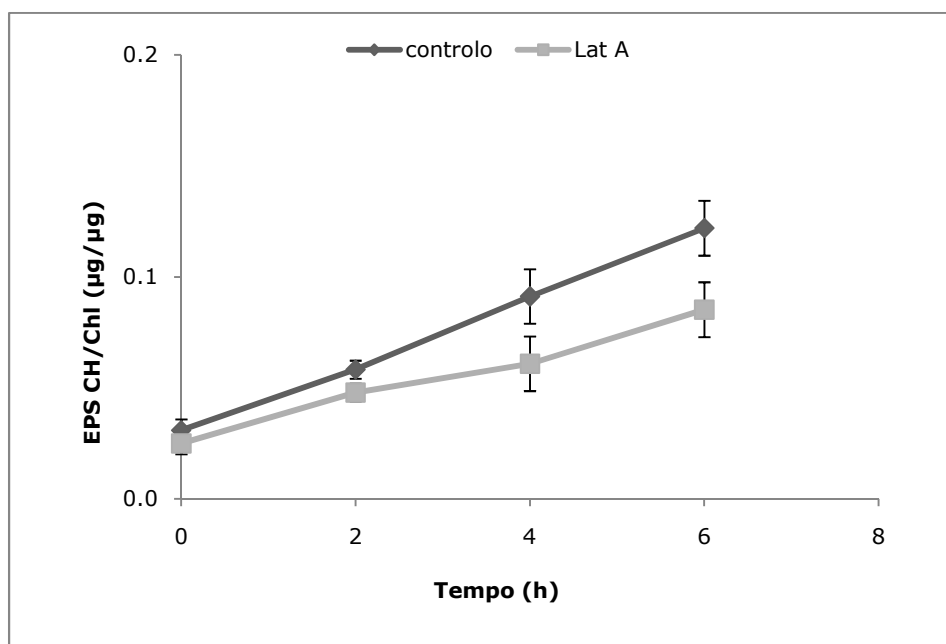


Figura 9 - Monitorização da produção de EPS ($\mu\text{g CH ml}^{-1}$ cultura) ao longo do tempo, em amostras controle e em amostras com adição de Lat A. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

A concentração de EPS inicial normalizada ao valor de Chl *a* não varia significativamente entre as amostras controle e as amostras expostas ao Lat A (Teste t "student", $T = 1,196$; $P = 0,298$). No entanto, ao fim de 6 h de tratamento, apesar de ambos exibirem acumulação de EPS, verificaram-se diferenças significativas entre a concentração de EPS nas amostras controle e nas amostras cuja motilidade foi inibida (Teste t "student", $T = 2,830$; $P < 0.05$)

Os parâmetros fisiológicos das amostras inibidas e com motilidade activa foram monitorizados ao longo do tempo de experiência, descartando potenciais efeitos da Latrunculina A na fisiologia celular bem como a possibilidade de efeitos negativos na fisiologia afectar a produção de EPS.

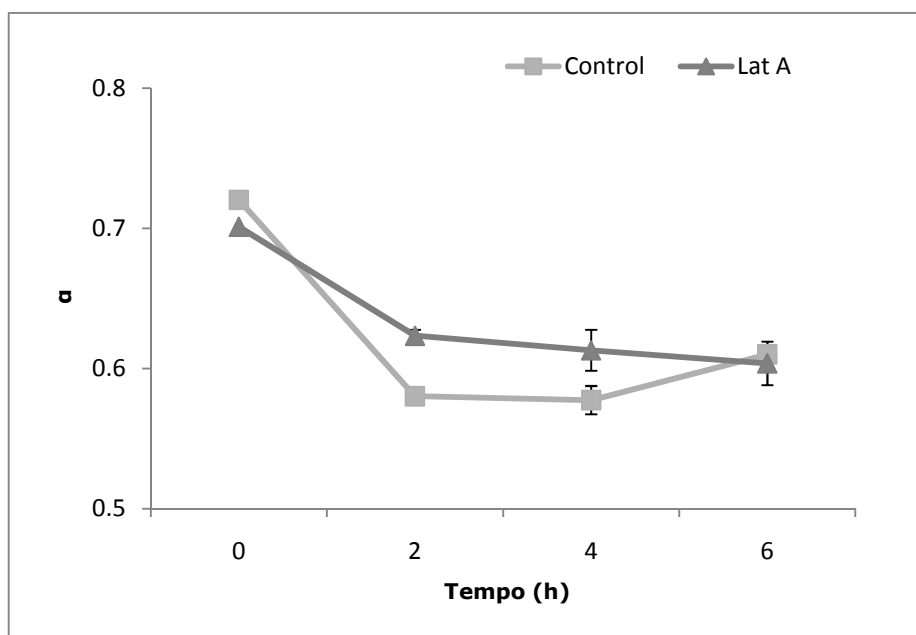


Figura 10 - Variação de α (Declive inicial da curva de luz), ao longo de um período de baixa-mar, amostras controle e em amostras com adição de Lat A. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

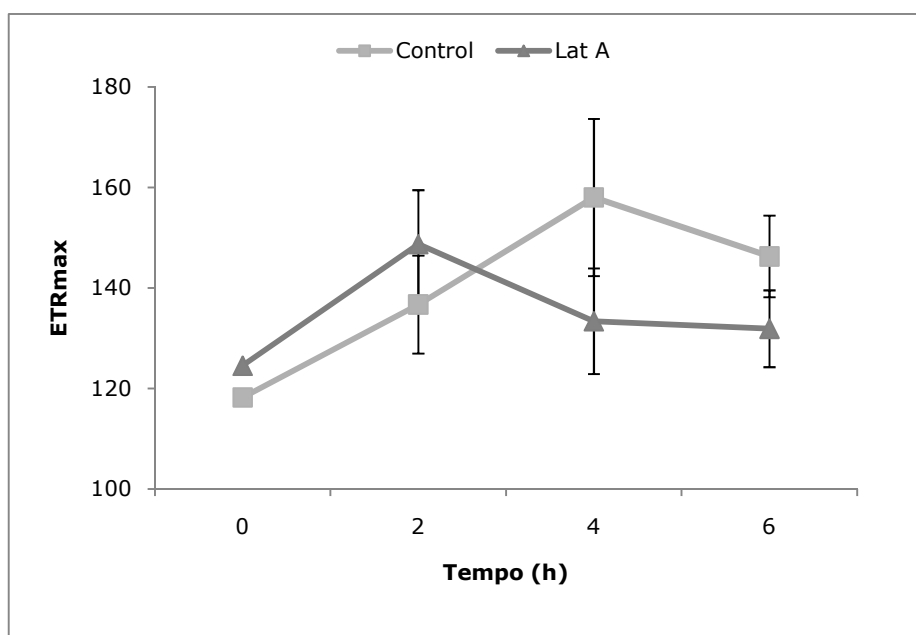


Figura 11 - Variação do ETR_{max} ao longo de um período de baixa-mar, em amostras controle e em amostras com adição de Lat A. Cada ponto representa a média de 3 réplicas. Cada barra representa 1 erro-padrão.

Tabela 3 - Resultados estatísticos do Teste t de "student" aplicado ao tempo final (t=6h) dos parâmetros α , ETR_{max} .

	Grau de Liberdade	T	P	
α	4	0.702	0.521	P>0.05
ETR_{max}	4	2.233	0.089	P>0.05

α e ETR_{max} apresentaram um padrão semelhante de variação em função do tempo nas amostras controle e amostras inibidas, não se verificando diferenças significativas (α : p = 0.521, ETR_{max} : p = 0.089).

4. Discussão

4.1. Suspensões naturais: variação horária

As comunidades que habitam as zonas intertidais estão sujeitas a uma variabilidade temporal significativa, ao longo de várias escalas de tempo: horária (variação dependente de diferentes estímulos ambientais: luz, temperatura, salinidade...), semi-lunar e sazonal (variação sazonal dos parâmetros ambientais, da composição taxonômica e do estado fisiológico das comunidades).

As diatomáceas epipélicas apresentam um sistema de rafe, e movimentam-se, permitindo às células migrarem através do sedimento (Round 1971; Hoagland et al. 1993). A força promotora desta migração é a libertação de EPS, cujo padrão de produção é dinâmico, variando com a curva de crescimento, fotossíntese, irradiância, nível de nutrientes e a própria capacidade endógena de migração vertical (Underwood e Paterson 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que os biofilmes microfitobênticos exibem ritmos endógenos de produção primária e de produção de carboidratos, em condições laboratoriais, na ausência da influência da maré e sob luz constante ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e que a produção máxima de hidratos de carbono ocorre durante períodos em que o sedimento deveria estar emerso, caso tivesse permanecido no campo (Smith e Underwood 1998).

A análise da variação da produção de EPS ao longo de um período de luz (11 horas), na ausência do estímulo da maré sugere que ocorre produção e em simultâneo consumo de CH, uma vez que não se verificou uma acumulação clara da concentração de CH em função do tempo.

Underwood et al.(1995) observaram que 75 a 80% dos carboidratos presentes na fracção coloidal existiam como açúcares livres. Estes garantem uma maior e mais instável fonte de carbono na superfície do sedimento (Smith et al. 1995). Esta evidência sugere que muitos dos carbonos detectados na fase coloidal são de origem recente. Quando estes CH se encontram disponíveis, são preferencialmente utilizados por bactérias (e por algas heterotróficas) deixando o restante material, mais complexo, intacto.

No entanto, a utilização de EPS não é necessariamente restrita a bactérias. Foi verificada heterotrofia entre diatomáceas e algumas observações indicam que estas decompõem EPS por si produzidos, utilizando-os como fonte de energia quando são privadas de luz (Smith e Underwood 2000; Staats et al. 2000).

Estudos realizados anteriormente sugerem que os EPS produzidos durante a emersão diurna desaparecem no início da fase de emersão noturna, sugerindo estes dados que os CH coloidais produzidos mais recentemente desaparecem rapidamente, podendo ser arrastados durante a imersão (Smith e Underwood 1998, de Winder et al. 1999) ou utilizados por consumidores heterotróficos (van Duyl et al. 1999, Middelburg et al. 2000).

O consumo de glucose pelos microrganismos inclui os seguintes processos (i) assimilação biológica (vias anabólicas), (ii) mineralização (vias catabólicas) e/ou (iii) reacção com outros componentes, o que resulta na formação de substâncias húmidas (Antonio e Bianchini Jr., 2003; Panhota e Bianchini Jr, 2003). Por outro lado, a aparente estabilidade na concentração de EPS ao longo do período de luz pode estar relacionada com a existência de produção de carboidratos em condições óptimas e nestas condições não haver necessidade de migrar, quer para procurar alimento quer na busca de condições ideais.

Os valores de F_v/F_m registados ao longo do estudo para as células expostas à luz, são equivalentes aos valores óptimos de referência, ou seja 0.7, indicando um bom estado fisiológico nas diatomáceas (Rijstenbil 2003). Tal indica que não existem condicionantes ao nível da fisiologia com implicações directas na produção de EPS, pelo que as não diferenças encontradas ao longo do período de luz, nada tem a ver com potenciais danos fisiológicos ao nível celular

A não acumulação de EPS pode ser justificada pela ausência de substrato e como tal não ocorre migração. As suspensões naturais foram expostas à luz no início de um período de baixa-mar associando-se a produção de EPS aos movimentos, em consequência do comportamento migratório. Para períodos maiores, de 24 e de 48 horas, que englobem vários ciclos de marés e consequentes migrações observa-se um aumento significativo da concentração de EPS ao longo do tempo. Este facto sugere que pode existir acumulação de

EPS devido à existência de outros organismos tais como bactérias, aos quais também é reconhecida a capacidade de produção de EPS.

4.2. Suspensões naturais: Luz vs. Escuro

Tal como já referido, a secreção de EPS é frequentemente associada à migração das diatomáceas (Edgar e Pickett-Heaps 1984, Lind et al. 1997). Em suspensões naturais verificaram-se diferenças na produção de EPS ricos em CH quando as mesmas são expostas a situações contrastantes de luz e de escuro, aumentando significativamente a produção na presença de luz. Tal pode estar directamente relacionado com a execução de migrações verticais pelas diatomáceas, embora em menor amplitude, na ausência de luz. Por outro lado, Smith e Underwood (1998) estudaram as taxas de produção de CH coloidais (solúveis em água) e de glucano (um produto resultante da fotossíntese das diatomáceas) em culturas axénicas e em sedimentos, tendo concluindo que a concentração de EPS aumenta significativamente durante períodos de escuridão. As concentrações de EPS no escuro correspondem a decréscimos da concentração de glucano, em culturas expostas à luz a concentração deste último aumenta. De facto, Smith e Underwood (1998, 2000) observaram a existência de produção de EPS no escuro, mesmo que em menor quantidade, indicando que uma fonte alternativa de carbono armazenado está disponível para a produção de EPS no escuro, em culturas e em sedimentos naturais. Observações semelhantes foram efectuadas por van Duyl et al. (1999) que observou que em sedimentos a concentração de CH aumenta no escuro.

Nas células expostas ao escuro manteve-se constante a concentração de CH, sem aumento nem consumo dos CH. No entanto, outros estudos mostraram que nos sedimentos intertidais, a libertação de EPS está associada à fotossíntese (Staats et al. 2000a, de Brouwer e Stal 2001), visto não ter sido observada a produção de EPS no escuro. Estes EPS associados exclusivamente à luz, são produzidos como resultado da exposição a factores que causam desequilíbrio no crescimento, tais como a elevada irradiância, ou quando os

nutrientes estão limitados (em particular o azoto). Durante o período de escuro os EPS desaparecem, provavelmente metabolizados para suprir a falta de energia das diatomáceas. Os EPS solúveis são produzidos continuamente assim que as culturas entram na fase estacionária de crescimento, ao contrário do que acontece com os “bound” EPS, que são excretados apenas na luz e em grande quantidade durante a fase exponencial (de Brouwer e Stal 2002). Mais de 90% dos “bound” EPS que são produzidos durante o período de luz são degradados no período de escuro seguinte. A elevada concentração de hidratos de carbono pode nesta experiência luz vs escuro dever-se ao facto das amostras utilizadas serem suspensões naturais e de que a presença destes CH pode não ser devidos apenas à produção por parte das diatomáceas bênticas, mas também a outros organismos presentes nos biofilmes.

4.3. Culturas: Variação ao longo do tempo em resposta a diferentes níveis de luz

As células microfitobênticas apresentam uma elevada capacidade de adaptação a ambientes luminosos muito variáveis, sendo que a exposição prolongada das células a irradiância elevada pode provocar danos ao nível do aparelho fotossintético. Neste sentido, o MPB desenvolveu estratégias comportamentais e fotofisiológicas para evitar as situações que lhe são prejudiciais, em particular a resposta rápida na execução de movimentos migratórios verticais em direcção a zonas com disponibilidade luminosa mais favorável (Kromkamp et al. 1998, Underwood e Kromkamp 1999, Perkins et al. 2002, Cohn et al. 2004).

A migração vertical das microalgas representa um mecanismo de fotoprotecção comportamental (Serôdio et al. 2006), para evitar os níveis de luz com um efeito mais inibitório, mantendo as células em condições óptimas para a realização da fotossíntese. Por outro lado, o processo adaptativo de fotoaclimação pode também torná-las menos vulneráveis à fotoinibição.

A produção de EPS é condicionada pela fotoaclimação, i.e. verificam-se diferenças na produção de EPS quando as células crescem em diferentes regimes de luz. Os resultados das experiências realizadas indicam que células fotoaclimatadas a regimes de luz muito limitados (LB) apresentam concentrações de EPS mais elevadas quando continuamente expostas a luz igualmente baixa; na presença de níveis médios e elevados de luz a produção é inferior. Isto sugere a limitação ou inibição da produção para níveis de luz mais altos, em paralelo com o que acontece na limitação da fotossíntese aquando da exposição a luz excessiva (fotoinibição).

A luz a que as células se encontram expostas pode influenciar a produção e o aumento de CH (Underwood e Paterson 2003). Perkins et al. (2001) demonstraram que biofilmes em condições naturais sujeitos a sombra (luz mais baixa) apresenta taxas mais elevadas de produção de EPS, o que sugere que níveis de luz baixos podem estimular o movimento celular e aumentar a produção de EPS, reconhecidamente associada à mobilidade das diatomáceas. Os resultados obtidos com as células fotoaclimatadas a luz alta demonstram um aumento na produção de EPS quando as células são, durante a experiência, expostas a irradiâncias médias. Cohn et al (1999) referiu uma resposta fototáctica das diatomáceas com dois comportamentos que desencadeiam uma variação na direcção do movimento: resposta migratória no sentido da luz, em situações de luz baixa ou moderada e uma resposta em fuga, quando as amostras são expostas a níveis de irradiância elevados, demonstrando que as diatomáceas apresentam uma resposta fotofóbica para níveis de luz prejudiciais.

4.4. Latrunculina A – Inibidor da motilidade celular

As espécies epipélicas são bem conhecidas, principalmente pela produção de grandes quantidades de exopolissacarídeos (Hoagland et al. 1993). A motilidade celular das diatomáceas é um processo muito estudado, associando-se este movimento à produção e excreção de exopolissacarídeos (Edgar & Pickett-Heaps 1984, Hoagland et al. 1993). Os CH excretados pelas

diatomáceas são dependentes de vários factores abióticos, em especial as grandes alterações na intensidade luminosa (Pinckney e Zingmark 1991).

Vários estudos mostraram a resposta das células à aplicação de inibidores específicos, quer na motilidade, na fotossíntese e consequentemente na produção de EPS. Culturas axénicas de *Cylindrotheca closterium* expostas à luz e incubadas com um inibidor da fotossíntese (3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetilureia) apresentaram inibição na produção de exopolissacarídeos (Staats et al. 2000). Wang et al (1997) observaram redução na motilidade, processo necessário à secreção de EPS, na diatomácea marinha *Achnanthes longines* na presença do inibidor da glucano sintetase, o 2,6-diclorobenzonitrilo (DCB), que actua na formação da parede celular. Esta descoberta evidencia que os glucanos estão envolvidos na produção de EPS. Verificou-se também que a utilização do inibidor DCB, não afectava a produção primária, mas a taxa de produção de CH coloidais, glucanos e EPS eram reduzidas (Underwood et al 2004). Na ausência de Ca^{2+} , demonstrou-se que a adesão das diatomáceas ao substrato era inibida (Cooksey 1981).

Cartaxana et al. (2008) confirmaram que quer o inibidor BDM (inibidor efectivo da miosina em células animais e plantas) quer o Lat A inibiam a motilidade das diatomáceas. Verifica-se a existência de uma forte relação entre a produção de EPS e a motilidade celular das diatomáceas sendo que esta hipótese é suportada pela observação de que a concentração de EPS diminui quando a motilidade das células é inibida na presença de Lat A. A Latrunculina A inibe a motilidade das diatomáceas, visto actuar na dissolução dos filamentos de actina associados ao rafe, sem afectar o rendimento fotossintético e o microambiente das células no biofilme (Cartaxana et al. 2008).

No presente estudo, observou-se uma redução da concentração de carboidratos em células fotoaclimatadas a luz alta e expostas a uma intensidade luminosa média quando incubadas com Lat A. No entanto, não se verificou uma inibição total da produção de CH na amostra onde foi aplicado o Lat A, talvez porque a concentração utilizada na preparação da solução do inibidor não fosse adaptada à espécie testada nesta experiência. O efeito

inibidor do Lat A mostrou ser rapidamente reversível como resultado da lavagem das células de diatomáceas com meio de cultura novo (Poulsen et al 1999).

Comparando os valores de α e ETR_{max} com os descritos na literatura existente pode concluir-se que o tratamento com Lat A não afectou a resposta das células à luz, (estão dentro dos valores de referência para os parâmetros relacionados com a eficiência e com a capacidade fotossintética (α e ETR_{max})).

A ausência de efeitos na actividade fotossintética, faz do Lat A um inibidor que permite compreender a importância da migração para as diatomáceas bênticas.

5. Conclusão

A caracterização da produção de EPS em culturas e em comunidades naturais provenientes do ambiente intertidal da Ria de Aveiro, permite concluir que existiu acumulação de EPS ao longo de um período de baixa-mar diurno (11 horas) assim como ao longo de um período de 24 horas, mantendo-se a concentração constante após este período e até às 48 horas (tempo de duração da experiência).

Relativamente à produção de exopolissacarídeos em comunidades naturais, comparando suspensões expostas à luz com suspensões mantidas no escuro, observou-se que a produção de EPS é mais elevada nas amostras expostas à luz.

Verificou-se também que em culturas, o nível de irradiância a que as células foram expostas no decorrer da experiência teve efeitos significativos na produção de EPS, sendo a concentração de CH depende do estado de fotoaclimação a que as células foram sujeitas na fase de crescimento.

A utilização do inibidor Latrunculina A permitiu concluir que mesmo células inibidas de motilidade apresentam capacidade de produzir e libertar EPS. Todavia, a taxa de acumulação de EPS no meio de cultura é muito inferior na presença do inibidor e quando comparada com as células em solução controlo (sem inibidor). Este facto sugere que a motilidade celular tem um papel significativo na produção de EPS.

6. Bibliografia

Admiral W (1984) The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. In: Round FE, Chapman DJ (editors) Progress in Phycological Research 3: 269-322. Biopress Bristol.

Antonio R M and Bianchi Jr. I (2003) Methodological tests of a heterotrophy index for aquatic ecosystems. Brazilian Journal of Biology 63 (3): 373-380.

Bartoli M, Nizzoli D, Viaroli P (2003) Microphytobenthos activity and fluxes at the sediment-water interface: interactions and special variability. Aquatic Ecology 37: 341-349.

Brotas V, Cabrita T, Portugal A, Serôdio J, Catarino F (1995) Spatiotemporal distribution of the microphytobenthic biomass in intertidal flats of Tagus Estuary (Portugal). Hidrobiologia 301:93-104.

Buffan-Dubau E, Carman K R (2000) Extraction of benthic microalgal pigments for HPLC analyses. Marine Ecology Progress Series 204: 293-297.

Cartaxana P and Serôdio J (2008) Inhibiting diatom motility: a new tool for the study of the photophysiology of intertidal microphytobenthic biofilms. Limnology and Oceanography: Methods 6: 466-476.

Cartaxana P, Brotas V and Serôdio J (2008) Effects of two motility inhibitors on the photosynthetic activity of the diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Pleurosigma angulatum*. Diatom Research 23:65-74.

Cohn S A, Spurck T P, Pickett-Heaps J D (1999) High energy irradiation at the leading tip of moving diatoms causes a rapid change of cell direction. Diatom Research 14(2): 193-206.

Cohn S A, Bahena M, Davis J T, Ragland R L, Rauschenberg C D, Smith B J (2004) Characterization of the diatom photophobic response to high irradiance. Diatom Research 19 (2):167-179.

Cooksey K E (1981) Requirement for calcium in adhesion of a fouling diatom to glass. Applied and Environmental Microbiology 41: 1378-1382.

Consalvey M, Paterson D.M, Underwood G.J.C (2004) The ups and downs of life in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. *Diatom Research* 19: 181-201.

Cunha M A, Dias J M, Almeida M A, Lopes J F and Alcântara F (2003) Fluxes of bacterioplankton between a tidal estuary and the sea: returning to the "Outwelling Hypothesis". *Aquatic Ecology* 37: 45-54.

Dade W B, Davis J D, Nichols P D, Nowell A R M, Thistle D, Trexler M B, White D C (1990) Effects of bacterial exopolymer adhesion on the entrainment of sand. *Geomicrobiology Journal* 8: 1-16.

Daniel G F, Chamberlain A H L, Jones E B G (1987). Cytochemical and electron microscopical observations on the adhesive materials of marine fouling diatoms. *Br Phycol Journal* 22:101-118.

de Brouwer J F C and Stal L J (2001) Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Marine Ecology Progress Series* 44: 218-233.

de Brouwer J F C and Stal L J (2002) Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia sp.* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 38: 464-472.

de Winder B, Staats N, Stal L J and Paterson D M (1999) Carbohydrate secretion by phototrophic communities in tidal sediments. *Journal of Sea Research* 42: 131-146.

Decho A W (1990) Microbial exopolymer secretion in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*. 28:73-153.

Decho A W (2000) Microbial biofilm in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20: 1257-1273.

Decho A W and Mariarty (1990) Bacterial exopolymer utilization by harpacticoid copepod: A methodology and results. *Limnology and Oceanography* 35:1039-1049.

Decho A W and Lopez (1993) Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive affects on trophic relationships. *Limnology and Oceanography* 38: 1633-1645.

Dias J M, Lopes J F and Dekeyser I (1999) Hydrological characterization of Ria de Aveiro, Portugal, in early summer. *Oceanologica Acta* 22, Nº5.

Dias J M, Lopes J F and Dekeyser I (2000) Tidal propagation in Ria de Aveiro Lagoon, Portugal. *Physics, Chemistry and Earth (B)*, 25: 369-374.

Dubois M, Giles K A, Hamilton J K, Rebers P A & Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Eaton J W, Moss B (1966) The estimation of numbers and pigments content in epipelagic algal populations. *Limnology and Oceanography* 11:584-595.

Edgar L A, Pickett-Heaps J D (1984) Diatoms locomotion. In Round FE, Chapman G (editors) *Progress in phycological research* 3. Biopress Ltd, Bristol, 47-88.

Gerbersdorf S U, Jancke T, Westrich B (2005) Physico-chemical and biological sediment properties determining erosion resistance of contaminated riverine sediments-temporal and vertical pattern at the Lauffen reservoir/River Neckar, Germany. *Limnologica* 35: 132-144.

Guillard R R L (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrate Animals* (W L Smith & M H Chanley, eds) 29-60. Plenum Press, New York.

Hoagland K D, Rosowski J R, Gretz M R & Roemer S C (1993) Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. *Journal of Phycology* 29: 537-556.

Hofmann T, Hanlon A R M, Taylor J D, Ball A S, Osborn A M, Underwood G J C (2009) Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Marine Ecology Progress Series* 379: 45-58.

Kashman Y, Groweiss A & Shmueli U (1980) Latrunculin, a new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge *Latrunculia magnifica*. *Tetrahedron Letters* 21: 3629-3632.

Kelly J, Honeywill C & Paterson D (2001) Microscale analysis of chlorophyll-*a* in cohesive, intertidal sediments: the implications of microphytobenthos distribution. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 81: 151-162.

Kingston M B (1999) Effect of light on vertical migration and photosynthesis of *Euglena proxima* (Euglenophyta). *Journal of Phycology* 35: 245-253.

Kromkamp J, Barranguet C and Peene J (1998) Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Marine Ecology Progress Series* 162: 45-55.

Kromkamp JC and Forster R M (2006) Developments in microphytobenthos primary production studies. Functioning of microphytobenthos in estuaries: Proceedings of the Colloquium, Amsterdam, 21-23 August 2003: 9-30.

Lind J L, Heimann K, Miller E A, van Vliet C, Hoogenraad N J, Wetherbee R (1997) Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycan. *Planta* 203:213-221.

Lorenz C J (1967) Determination of Chlorophyll *a* and pheopigments Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12:343-346.

MacIntyre H L, Geider R J, Miller D C (1996) Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats, I. Distribution, abundance and primary production *Estuaries* 19: 186-201.

Middelburg J J, Barranguet C, Boscher H T S, Herman P M J, Moens T, Heip C H R (2000) The fate of intertidal microphytobenthos carbon: An in situ P13PC-labeling study. *Limnology and Oceanography* 45: 1224-1234.

Orvain F, Galois R, Barnard C, Sylvestre A, Blanchard G, Sauriau P G (2003) Biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microbial Ecology* 45: 237-251.

Panhota R S, Bianchi Jr. I, Vieira A A.H (2007) Glucose uptake and extracellular polysaccharides (EPS) produced by bacterioplankton from an eutrophic tropical reservoir (Barra Bonita, SP-Brazil). *Hidrobiologia* 583:223-230.

Paterson D M, Hagerthey S E (2001) Microphytobenthos in contrasting coastal ecosystems: biology and dynamic. In: Reise, K (Ed.) (2001) Ecological comparisons of sedimentary shores. *Ecological Studies: analysis end synthesis* 151:105-125.

Perkins R G, Underwood G J C, Brotas V, Snow G C, Jesus B, Ribeiro L (2001) Responses of microphytobenthos to light: primary production and carbohydrate allocation over an emersion period. *Marine Ecology Progress Series* 223: 101-112.

Perkins R G, Oxborough K, Hanlon A R M, Underwood G J C, Baker N R (2002) Can chlorophyll fluorescence be used to estimate the rate of photosynthetic electron transport within microphytobenthic biofilmes) *Marine Ecology Progress Series* 228: 47-56.

Pinckey J, Piceno Y, Lovell C R (1994) Short-term changes in the vertical distribution of benthic microalgal biomass in intertidal muddy sediments. *Diatom research* 9 (1): 143-153.

Platt T, Gallegos C L, Harrison W G (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38:687-701.

Pinckney J & Zingmark R G (1991) Effects of tidal stage and sun angles on intertidal benthic microbial productivity. *Marine Ecology Progress Series* 76:81-89.

Poulsen N C, Spector I, Spurck T P, Shultz T F & Wetherbee R (1999) Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 44:23-33.

Rijstenbi J W (2003) Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defense of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. *Marine Ecology Progress Series*, 254: 37-48.

Round F E, Palmer J D (1966) Persistent, vertical-migration rhythms in benthic microflora: II. Field and laboratory studies of diatoms from the banks of the River Avon. *Journal of Marine Biology Association of UK* 46: 191-214.

Round F E (1971) Benthic marine diatoms. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 9: 83-139.

Savage D C and Fletcher M (1985) Bacterial adhesion. Academic

Serôdio J, da Silva J M, Catarino F (1997) Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using in vivo chlorophyll *a* fluorescence. *Journal of Phycology* 33: 542-553.

Serôdio J, Catarino F (1999) Fortnightly light and temperature variability in estuarine intertidal sediments and implications for microphytobenthos primary productivity. *Aquatic Ecology* 33: 235-241.

Serôdio J, Catarino F (2000) Modelling the primary productivity of intertidal Microphytobenthos: time scales of variability and effects of migratory rhythms. *Marine Ecology Progress Series* 192:13- 30.

Serôdio J (2004) Analysis of variable chlorophyll fluorescence in microphytobenthos assemblages: implications of the use of depth-integrated measurements. *Aquatic Microbial Ecology* 36:137-152.

Serôdio J, Vieira S, Cruz S, Barroso F (2005) Short-term variability in the photosynthetic activity of microphytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence. *Marine Biology* 146: 903-914.

Serôdio J, Coelho H, Vieira S, Cruz S (2006) Microphytobenthos vertical migratory photoresponse as characterised by light-response curves of surface biomass. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 68: 547-556.

Smith D C, Steward G F, Long R A and Azam F (1995) Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep Sea Research-II*, 42: 75-97.

Smith D J and Underwood G J C (1998) Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. *Limnology and Oceanography* 43: 1578-1591.

Smith D J and Underwood G J C (2000) The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effect of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology* 36:321-333.

Staats N, de Winder B, Stal L J, Mur L R (1999) Isolation and characterisation of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navícula salinarum*. *European Journal of Phycology* 34: 161-169.

Staats N, Stal L J, de Winder B & Mur L R (2000) Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 193: 261-291.

Stal L J & de Brouwer J F C (2003) Biofilm formation by benthic diatoms and their influence on the stabilization of intertidal mudflats. *Berichte – Forschungszentrum TERRAMARE* nº12.

Stal L J (2003) Microphytobenthos, their extracellular polymeric substances, and the morphogenesis of intertidal sediments. *Geomicrobiology Journal* 20: 463-478.

Tyler A C, McGlathery K J, Anderson I C (2003) Benthic algae control sediment-water column fluxes of organic and inorganic nitrogen compounds in a temperate lagoon. *Limnology and Oceanography* 48: 2125-2137.

Underwood G J C, Paterson D M, Parkes R J (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnology and Oceanography* 40: 1243-1253.

Underwood G J C, Kromkamp J (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In: *Advances in Ecological Research* 29: 93-153.

Underwood G J C and Paterson D M (2003) The importance of extracellular carbohydrates production by marine epipelagic diatoms. *Advances in Botanical Research* 40: 183-240.

Underwood G J C, Boulcott M, Raines C A, Waldron K (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms-dynamics, changes in composition and pathways of production, *Journal of Phycology* 40:293-304.

van Duyl F C, de Winder B, Kop A C & Wollenzien U (1999) Tidal coupling between carbohydrates concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats. *Marine Ecology Progress Series* 191:19-32.

Wang Y, Lu J, Mollet J C, Gretz M R, Hoagland K D (1997) Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). II. 2,6-dichlorobenzonitrile inhibition of motility and stalk production in the marine diatom *Chaetoceros longipes*. *Plant Physiology* 113: 1071-1080.

Yarmola E G, Somasundaram T, Boring T A, Spector I & Bubb M R (2000) Actin-latrunculin A Structure and function. *Journal of Biological Chemistry* 275: 28120-28127.

Zar J H (1996) *Biostatistical Analysis* 3rd ed. Prentice Hall International Editions, Upper Saddle River, New Jersey, USA.